

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390075

研究課題名（和文）RICS/PX-RICSによる活動依存的スパイン形態変化の制御機構

研究課題名（英文）Activity-dependent regulation of spine morphology by RICS/PX-RICS

研究代表者

秋山 徹（AKIYAMA TETSU）

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号：70150745

研究成果の概要（和文）：RICSは神経細胞のシナプス後部に局在し、興奮性シグナルとシナプス接着とのリンクに関係すると考えられている。本研究でノックアウトマウス由来神経細胞を用いた解析を行い、NMDA受容体→CaMKII→RICS→Cdc42およびJNKというシグナル伝達経路を見出した。PX-RICSは、非神経細胞ではN-cadherin/ β -catenin複合体の輸送に関与することが示されている。本研究で、PX-RICS依存的輸送系の構成因子が、spine apparatus（樹状突起に広く分布する小胞体・ゴルジ体様の膜構造）に局在することを見出した。したがって、PX-RICS依存的輸送系が、樹状突起およびスパインにおいても機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： Postsynaptic protein RICS is thought to serve as a link between excitatory signaling and synaptic adhesion. In this research project, we showed that, by using hippocampal neurons of RICS knockout mice, RICS functions downstream of NMDA/CaMKII signaling and upstream of Cdc42/JNK signaling. We also demonstrated that PX-RICS, a splicing variant of RICS, is localized to the spine apparatus together with its cargos (N-cadherin, β -catenin), linkers (GABARAP, 14-3-3) and motors (dynein, dynactin). These findings suggest that PX-RICS-dependent trafficking system works in dendrites and/or dendritic spines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：細胞内情報伝達、分子神経生物学、神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

(1) 高次脳機能に直接関係するニューロンの樹状突起には、スパインと呼ばれる棘状の突起が無数に見られる。個々のスパインは他のニューロンの神経終末と興奮性シナプスを形成しており、脳の情報処理を担う最小単

位のコンパートメントと考えられている。その形態は、フィロポディア様の細長い突起型（未成熟型）から頭部・頸部が分化したマッシュルーム型（成熟型）まで多様性に富み、しかもシナプス活動に依存して新生・形態変化・消失をダイナミックに繰り返す。これら

の事実から、スパインの形態変化は高次脳機能と密接な関係があると考えられている。スパインの形態は豊富なアクチン線維により維持されているので、その形態変化にはアクチン線維の再編成が必須である。したがって、アクチン動態制御の主役である Rho ファミリー GTPase (RhoA, Rac1, Cdc42) とその制御因子 (GAP, GEF 等) が高次脳機能に重要な役割を果たしていることは、想像に難くない。

私たちは、シナプス後肥厚 (PSD) に局在する Cdc42GAP である RICS (RhoGAP involved in the β -catenin-N-cadherin and NMDA receptor signaling) と、そのスプライシングバリエーションで小胞体およびゴルジ体に局在する PX-RICS を同定した。これまでに得た研究成果から、RICS は NMDA シグナル下でのアクチン動態の制御に、PX-RICS は細胞内輸送を介したシナプス接着の制御にそれぞれ関与していることが示唆されている。

(2) RICS は、 β -catenin 結合タンパク質として同定した新規 Cdc42GAP である。大脳皮質や扁桃体など高次脳機能を司る領域のニューロンで特に強く発現し、NMDA 受容体、PSD-95、N-cadherin および β -catenin との複合体の形でシナプス後肥厚 (PSD) に局在している。NMDA 受容体の下流で働く CaMKII によってリン酸化を受けると、GAP 活性が抑制される。さらに RICS は、活性化型 Cdc42 のエフェクターである PAK3/5 と結合することを見出している。したがって、Cdc42 の下流では PAK3/5 \rightarrow LIMK1/2 \rightarrow cofilin (アクチン脱重合促進因子) の経路が動いてアクチン線維の状態を変化させ、スパインの形態変化が誘導されると予想される。実際、RICS ノックアウトマウスの初代培養ニューロンでは、フィロポディア様 (未成熟型) スパインの割合が増加し、マッシュルーム型 (成熟型) スパインの割合が相対的に減少していることを見出している。さらに、PAK3/5 ノックアウトマウスにスパイン形態異常が見られることが知られている。以上を総合すると、シナプス活動に依存してスパイン形態が変化する際には、右図のようなシグナル伝達経路が動くことが予想され、本研究の着想に至った。

(3) シナプス活動に伴い樹状突起からスパインへ β -catenin が移行し、シナプスのサイズや伝達を増強することが知られている。さらに、シナプス活動により誘導されるスパインの形態変化に、N-cadherin (とアクチン骨格) が必須であることが示されている。これらの事実から、スパインの形態変化には、N-cadherin/ β -catenin 複合体を介したシナプス接着の変化が連動して起こる必要があることが示唆される。

RICS とは異なり、PX-RICS は神経系以外の

組織や培養細胞でも発現している。N 末端側に RICS には存在しない PX ドメインがあり、phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) との結合を介して小胞体およびゴルジ体に局在する。私たちは、PX-RICS が RICS とは全く異なる独自の機能をもつこと、すなわち微小管結合タンパク質 GABARAP や複数のモータータンパク質と協調して N-cadherin/ β -catenin 複合体の小胞体 \rightarrow ゴルジ体輸送を制御し、その結果として細胞の接着能を制御することを明らかにした (Genes Dev 22, 1244-1256, 2008)。ニューロンでは、樹状突起やスパイン内にもサテライト的な小胞体およびゴルジ体が存在し、樹状突起内や樹状突起-スパイン間のローカルなタンパク質輸送を行っている。私たちは、PX-RICS および GABARAP が樹状突起内の小胞体・ゴルジ体に局在していることを見出している。以上の知見を総合し、PX-RICS が N-cadherin/ β -catenin 複合体の樹状突起内および樹状突起-スパイン間輸送を制御することにより、シナプス接着、ひいてはスパイン形態を制御するという着想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、RICS および PX-RICS が、それぞれ独自の作用機構によりスパインの形態を制御することを立証し、高次脳機能の分子基盤のひとつとして確立することを目的とする。

(1) RICS によるスパイン形態の制御機構

NMDA シグナルからスパイン形態の変化に至る経路は、事実として認知されている部分 (NMDA シグナル \sim CaMKII および Cdc42 \sim cofilin) と、私たちが新たに見出した部分 (CaMKII \sim PAK3/5) とを併せて構築したもので、これらの連続性を示すエビデンスはない。これらがパスウェイとして連続して動くことを証明する。さらに、このシグナル伝達経路が、実際にポストシナプスにおいてスパイン形態を制御していることを示す。以上の解析により経路全体を構築する。

(2) PX-RICS によるスパイン形態の制御機構

PX-RICS が、シナプス活動依存的に、N-cadherin/ β -catenin 複合体の樹状突起内および樹状突起-スパイン間輸送に携わることによって、スパイン形態の変化を制御していることを立証する。

3. 研究の方法

RICS によるスパイン形態の制御機構および PX-RICS によるスパイン形態の制御機構に関して、詳細な解析を行う。

(1) RICS によるスパイン形態の制御機構

初年度は、初代培養ニューロンの系で siRNA や阻害剤等を駆使し、NMDA 刺激から cofilin までのシグナル伝達の連続性・各コンポーネントの上下関係などを示す。さらに、スパインにおける内在性 Cdc42 の活性変化を可視化するため、バイオセンサーの系を確立する。次年度以降は、NMDA 刺激から cofilin までのシグナル伝達経路がスパイン形態を制御することを、スパインのタイムラプスイメージングにより示す。さらに、初年度に確立したバイオセンサーの系を用い、NMDA 刺激により内在性 Cdc42 の活性変化がスパインで起きていることを、タイムラプスイメージングにより示す。

(2) PX-RICS によるスパイン形態の制御機構
初年度に、樹状突起内および樹状突起-スパイン間の輸送を可視化できる系を確立する。これには、種々の蛍光タンパク質を融合させた N-cadherin および β -catenin を用いる。次年度以降は、この系を用いて N-cadherin/ β -catenin 複合体の輸送を解析し、シナプス活動 (NMDA 刺激) 依存性や PX-RICS 等の関与を明らかにする。

4. 研究成果

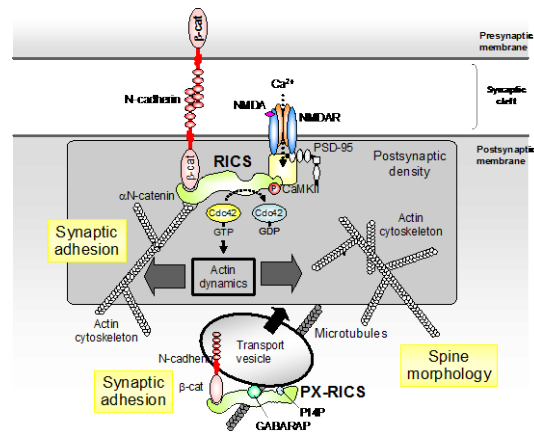
(1) マウス海馬ニューロンを NMDA 刺激すると、RICS のリン酸化が亢進することを見出した。CaMKII インヒビター処理によりこのリン酸化が阻害されることから、NMDA 受容体 \rightarrow CaMKII \rightarrow RICS の経路が示唆された。さらに、KO マウス由来ニューロンを用いた解析により、RICS の下流で Cdc42 および JNK の経路が動くことを見出した (右上図)。

(2) PX-RICS 依存的輸送系の構成因子の樹状突起およびスパインにおける局在を、免疫蛍光染色により解析した。その結果、cargo である N-cadherin および β -catenin、リンカーである 14-3-3 ζ / θ および GABARAP、モータータンパク dynein/dynactin のいずれもが、spine apparatus (樹状突起に広く分布する小胞体・ゴルジ体様の膜構造) に局在することを見出した。したがって、PX-RICS 依存的輸送系が、樹状突起およびスパインにおいても機能している可能性が強く示唆された (右上図)。

(3) RICS/PX-RICS は、私たちが世界に先駆けて分子レベルから個体レベルまで機能を解析している GAP で、本研究計画遂行中においても、国内外からの類似の研究は現れず、新規性・独自性が高い成果を挙げ得た。

(4) 私たちは、RICS/PX-RICS ノックアウトマウスの詳細な行動実験を行い、扁桃体依存性の情動に異常を生じ、低不安状態および多動

傾向にあることが判明している。この結果は、RICS/PX-RICS が高次脳機能の制御に重要なシステムのひとつであることを示している。さらに、この表現型はヒトの注意欠陥多動性障害 (ADHD) と類似している。興味深いことに、多くの精神疾患ではスパイン形態に異常を認めるという知見もある。さらなる厳密な行動実験や薬理的解析が必要ではあるが、ADHD を始めとする精神疾患の本態や発症機序の解明にも貢献できる可能性が考えられる。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計15件)

① Matsuura K, Jigami T, Taniue K, Morishita Y, Adachi S, Senda T, Nonaka A, Aburatani H, Nakamura T, Akiyama T. Identification of a link between Wnt/ β -catenin signalling and the cell fusion pathway. *Nature Commun* 2, 548, 2011. 査読有
DOI: [10.1038/ncomms1551](https://doi.org/10.1038/ncomms1551)

② Morishita EC, Murayama K, Kato-Murayama M, Ishizuka-Katsura Y, Tomabeche Y, Hayashi T, Terada T, Handa N, Shirouzu M, Akiyama T, Yokoyama S. Crystal structures of the armadillo repeat domain of adenomatous polyposis coli and its complex with the tyrosine-rich domain of sam68. *Structure* 19, 1496-1508, 2011. 査読有
DOI: [10.1016/j.str.2011.07.013](https://doi.org/10.1016/j.str.2011.07.013)

③ Taniue K, Oda T, Hayashi T, Okuno M, Akiyama T. A member of the ETS family, EHF, and the ATPase RUVBL1 inhibit p53-mediated apoptosis. *EMBO Rep* 12, 682-689, 2011. 査読有

[DOI: 10.1038/embor.2011.81](https://doi.org/10.1038/embor.2011.81)

④ Hasegarwa, Y, Iizuka-Kogo, A, Akiyama, T, Senda T. High expression of Pitx-1 in the ICAT-deficient metanephros leads to developmental arrest. *Acta Histochem Cytochem* 43, 51-59, 2010. 査読有
[DOI: 10.1267/ahc.09028](https://doi.org/10.1267/ahc.09028)

⑤ Roy BC, Kohno T, Iwakawa R, Moriguchi T, Kiyono T, Morishita K, Sanchez-Cespedes M, Akiyama T, Yokota J. Involvement of LKB1 in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) of Human Lung Cancer Cells. *Lung Cancer* 70, 136-145, 2010. 査読有
[DOI: 10.1016/j.lungcan.2010.02.004](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.02.004)

⑥ Taniue K, Nishida A, Hamada F, Sugie A, Oda T, Ui-Tei K, Tabata T, Akiyama T. Sunspot, a link between Wingless signaling and endoreplication in *Drosophila*. *Development* 137, 1755-1764, 2010. 査読有
[DOI: 10.1242/dev.042077](https://doi.org/10.1242/dev.042077)

⑦ Nakamura T, Hayashi T, Mimori-Kiyosue Y, Sakaue F, Matsuura K, Iemura S, Natsume T, Akiyama T The PX-RICS-14-3-3 ζ / θ complex couples N-cadherin- β -catenin with dynein-dynactin to mediate its export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 285, 16145-16154, 2010. 査読有
[DOI: 10.1074/jbc.M109.081315](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.081315)

⑧ Niimi R, Matsumine A, Iino T, Murata T, Shintani K, Nakazora S, Nakamura T, Uehara Y, Kusuzaki K, Akiyama T, Uchida A. The expression of hDlg as a biomarker of the outcome in malignant fibrous histiocytomas. *Oncol Rep.* 23, 631-638, 2010. 査読有
[DOI: 10.3892/or_00000678](https://doi.org/10.3892/or_00000678)

⑨ Kawasaki Y, Jigami T, Furukawa S, Sagara M, Echizen K, Shibata Y, Sato R, Akiyama T. The adenomatous polyposis coli-associated guanine nucleotide exchange factor Asef is involved in angiogenesis. *J Biol Chem* 285, 1199-1207, 2010. 査読有
[DOI: 10.1074/jbc.M109.040691](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.040691)

⑩ Kawasaki Y, Tsuji S, Muroya K, Furukawa S, Shibata Y, Okuno M, Ohwada S, Akiyama T. The APC-associated exchange factors Asef and Asef2 are required for adenoma formation in *Apc^{Min/+}* mice. *EMBO Rep* 10, 1355-1362, 2009. 査読有

[DOI: 10.1038/embor.2009.233](https://doi.org/10.1038/embor.2009.233)

⑪ Yamazumi Y, Kamiya A, Nishida A, Nishihara A, Iemura S, Natsume T, Akiyama T. The transmembrane nucleoporin NDC1 is required for targeting of ALADIN to nuclear pore complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 389, 100-104, 2009. 査読有
[DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.08.096](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.096)

⑫ Kawajiri K, Kobayashi Y, Ohtake F, Ikuta T, Matsushima Y, Mimura J, Pettersson S, Pollenz RS, Sakaki T, Hirokawa T, Akiyama T, Kurosumi M, Poellinger L, Kato S, Fujii-Kuriyama Y. Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in *ApcMin/+* mice with natural ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 13481-13486, 2009. 査読有
[DOI: 10.1073/pnas.0902132106](https://doi.org/10.1073/pnas.0902132106)

⑬ Kawasaki Y, Tsuji S, Sagara M, Echizen K, Shibata Y, Akiyama T. APC and Asef function downstream of the HGF receptor and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 284, 22436-22443, 2009. 査読有
[DOI: 10.1074/jbc.M109.020768](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.020768)

⑭ Niida A, Smith AD, Imoto S, Aburatani H, Zhang MQ, Akiyama T. Gene set-based module discovery in the breast cancer transcriptome. *BMC Bioinformatics* 10, 71, 2009. 査読有
[DOI: 10.1186/1471-2105-10-71](https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-71)

⑮ Sagara M, Kawasaki Y, Iemura SI, Natsume T, Takai Y, Akiyama T. Asef2 and Neurabin2 cooperatively regulate actin cytoskeletal organization and are involved in HGF-induced cell migration. *Oncogene* 28, 1357-1365, 2009. 査読有
[DOI: 10.1038/onc.2008.478](https://doi.org/10.1038/onc.2008.478)

[学会発表] (計4件)

① 中村勉, 林寛敦, 清末優子, 坂上史佳, 松浦憲, 家村俊一郎, 夏目徹, 秋山徹. PX-RICS/14-3-3 ζ / θ 複合体は N-cadherin/ β -catenin 複合体と dynein/dynactin 複合体をリンクしその小胞体輸出を制御する. 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 24 日, 大阪.

② 松浦憲, 地神貴史, 谷上賢瑞, 森下保幸, 足達俊吾, 千田隆夫, 油谷浩幸, 中村勉, 秋山徹. Wnt/ β -catenin シグナルが細胞融合シグナルを制御する新規シグナル伝達経路の同定. 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010

年 9 月 22 日, 大阪.

③ 中村勉, 林寛敦, 清末優子, 坂上史佳, 松浦憲, 家村俊一郎, 夏目徹, 秋山徹. PX-RICS/14-3-3 ζ / θ 複合体は N-cadherin/ β -catenin 複合体と dynein/dynactin 複合体をリンクしその小胞体輸出を制御する. 第 62 回日本細胞生物学会大会, 2010 年 5 月 20 日, 大阪.

④ 中村勉, 林寛敦, 那須-西村教子, 坂上史佳, 森下保幸, 夏目徹, 松浦憲, 秋山徹. PX-RICS は N-cadherin/ β -catenin 複合体の小胞体-ゴルジ体輸送を制御する. ミニシンポジウム (細胞間接着研究の新展開), 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009 年 6 月 3 日, 名古屋.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 徹 (AKIYAMA TETSU)
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
研究者番号: 70150745

(2) 研究分担者

中村 勉 (NAKAMURA TSUTOMU)
東京大学・分子細胞生物学研究所・講師
研究者番号: 30302798

(3) 連携研究者

()

研究者番号: